



УКРАЇНА

(19) UA (11) 15873 (13) U  
(51) МПК (2006)  
A61B 5/145  
G01N 33/49  
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ РАННЬОЇ ДІАГНОСТИКИ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН

1

(21) u200601046  
(22) 06.02.2006  
(24) 17.07.2006  
(46) 17.07.2006, Бюл. № 7, 2006 р.  
(72) Швачко Людмила Павлівна, Потопальський  
Анатолій Іванович, Бух Інна Георгіївна, Степанен-  
ко Аркадій Павлович, Процик Володимир Семено-  
вич, Кікоть Володимир Онуфрійович, Гульчій Ми-  
кола Васильович  
(73) Швачко Людмила Павлівна, ІНСТИТУТ  
ОЗДОРОВЛЕННЯ І ВІДРОДЖЕННЯ НАРОДІВ  
УКРАЇНИ  
(57) Спосіб ранньої діагностики злоякісних пухлин,  
що включає операцію дослідження цитогенетичних

2

порушень хромосомної організації на клітинах кро-  
ві, за результатами якої виконують ранню діагнос-  
тику злоякісних пухлин, який відрізняється тим,  
що виконання операції дослідження цитогенетич-  
них порушень хромосомної організації на клітинах  
крові виконують в присутності ДНК-  
деметилуючого реагенту та протипухлинного пре-  
парату, а за результатами дослідження виявляють  
ранній аномальний механізм ДНК-  
гіпометилування на рівні соматичних клітин крові  
при пухлинній прогресії та оцінюють протекторні  
можливості протипухлинного препарату на ранній  
стадії при пухлинній прогресії.

Пропонована корисна модель відноситься до  
медицини, зокрема до способів ранньої діагности-  
ки злоякісних пухлин.

Відомий спосіб ранньої діагностики злоякісних  
пухлин, що включає операцію дослідження цито-  
генетичних порушень хромосомної організації на  
клітинах крові, за результатами якої виконують  
ранню діагностику злоякісних пухлин [Декларацій-  
ний патент України на винахід № 64533 А, МПК 7  
A61 B5/00, G01N33/49, G01 N33/48; дата публіка-  
ції: 16.02.2004 р., Бюл. № 2, 2004 р.]. У відповідно-  
сті до описаного способу ранню діагностику вста-  
новлюють на основі виявлення деконденсації  
центромерного гетерохроматину у вигляді дифузії  
центромер (за DAPI гетерохроматин-специфічним  
флуоресцентним барвником), як критерію появи  
передчасного розділення хроматид та С-  
анафазного каріотипу на стадії метафази мітотич-  
ного поділу клітин крові, поза пухлиною.

Недоліком описаного способу є невизначе-  
ність молекулярно-генетичних підстав надмолеку-  
лярних змін деконденсації гетерохроматину на  
стадії метафази, оскільки в мітотичному поділі  
клітини стадія метафази (Gi/M) є ключовою стаді-  
єю для визначення максимальної конденсації та  
упаковки гетерохроматину перед розходженням  
хроматид до мітотичного веретина та цитокінезом.

Окрім сказаного, недоліком описаного способу є і  
невизначеність стану гетерохроматину на попере-  
дній стадії мітотичного поділу - стадії інтерфазної  
деконденсації та реплікації гетерохроматину  
(Gi/S).

Найбільш близьким до пропонованого способу  
за кількістю суттєвих ознак є спосіб ранньої діа-  
гностики злоякісних пухлин, що містить операцію  
дослідження цитогенетичних порушень хромосо-  
мної організації на клітинах крові, за результатами  
якої виконують ранню діагностику злоякісних пух-  
лин [заявка на корисну модель № u 200508943 від  
21.09.2005 р.].

Недоліком згаданого способу є те, що він не  
дозволяє оцінити протекторні можливості протипу-  
хлинного препарату щодо корекції раннього ано-  
мального механізму ДНК-гіпометилування сома-  
тичних клітин крові під час застосування такого  
препарату хворим.

У основу пропонованої корисної моделі поста-  
влено задачу створення такого способу ранньої  
діагностики злоякісних пухлин, який би дозволив  
оцінити протекторні можливості протипухлинного  
препарату щодо корекції раннього аномального  
механізму ДНК-гіпометилування соматичних клі-  
тин крові під час застосування такого препарату  
хворим.

UA (19) 15873 (11) U (13)

Поставлена задача вирішується використанням запропонованого способу, який, як і відомий спосіб ранньої діагностики злоякісних пухлин, містить операцію дослідження цитогенетичних порушень хромосомної організації на клітинах крові, за результатами якого виконують ранню діагностику злоякісних пухлин, а, відповідно до пропозиції, операцію дослідження цитогенетичних порушень хромосомної організації на клітинах крові виконують в присутності ДНК-деметилуючого реагенту та протипухлинного препарату, а за результатами дослідження виявляють ранній аномальний механізм ДНК-гіпометилування на рівні соматичних клітин крові при пухлинній прогресії та оцінюють протекторні можливості протипухлинного препарату на ранній стадії при пухлинній прогресії.

Суть запропонованої корисної моделі пояснюється графічними матеріалами та фотографіями, де:

На фіг.1 показано спектри флуоресценції "Амітозину" (А) з нативними препаратами геномних ДНК здорового донора (В) та при пухлинній прогресії (С).

На фіг.2 наведена діаграма амітозин-специфічної флуоресценції культури лімфоцитів периферійної крові хворих на онкологічну прогресію та при дії ДНК-деметилуючого реагенту 5'-Аза-цитидину в культурі лімфоцитів здорових донорів.

На фото 1-4 показана специфічна флуоресценція "Амітозину" з культурою лімфоцитів при пухлинній прогресії та дії ДНК-деметилуючого реагенту 5-Аза-цитидину. При цьому на фото 1 - контроль; на фото 2 - колоректальний рак; на фото 3 - рак щитовидної залози; на фото 4 - 5-Аза-цитидин. На фото 5 показано профіль генетичного поліморфізму ДНК-метилтрансферазного гену при пухлинній прогресії за результатами ПЛР - ампліфікації.

Авторами експериментально встановлено, що ключовим механізмом специфічного соматичного мутагенезу при канцерогенезі є епігенетичне ДНК-гіпометилування геному, суттєвим проявом якого є глобальне гіпометилування Alu повторів, найчисельніших за часткою (до 5%) типових сателітних ДНК-повторів прицентромерного/центромерного гетерохроматину [заявка на корисну модель № u200508943 від 21.09. 2005 р.]. Саме стан ДНК-гіпометилування геному через глобальне деметилування Alu повторів корелював з виявленою нами деконденсацією прицентромерного/центромерного гетерохроматину метафазних хромосом та центромерною нестабільністю, що поєднувалась з появою передчасного розділення сестринських хроматид в популяції лімфоцитів периферійної крові у хворих на онкологічну прогресію [Деклараційний патент України на винахід № 64533А, 2004 р.]. Явище передчасного розділення сестринських хроматид лежить в основі перш за все аномальної сегрегації хромосом до полюсів мітотичного веретена та анеупloidії (зміненим числом хромосом у каріотипі як в більшу так і в меншу сторону), що типово супроводжує пухлинну прогресію та є однією з головних сучасних парадигм механізму розвитку канцерогенезу [MehesK. Nonrandom centromere division: a mechanism of nondisjunction causing aneuploid. /

Human Genet,- 1978, v.28, N2, pp.255-260 ]. Тому, зауважуючи на ключовій ролі ДНК-гіпометилування у феномені передканцерозного механізму пухлинної прогресії, важливо підкреслити функціональну індукцію геномним ДНК-гіпометилуванням стану деконденсації перичентромерного/центромерного гетерохроматину (на стадії метафази -максимальної конденсації хроматину), опосередкованої значним деметилуванням сателітними ДНК- повторів, як основних структурних елементів гетерохроматину. Одним з протипухлинних препаратів, що досліджувалися для виявлення феномену ДНК-гіпометилування в ранньому механізмі пухлинної прогресії був Амітозин. Так, саме за аутофлуоресценції амітозину [Потопальський А.І. Препарати чистотілу в біології та медицині. // Київ: Наукова Думка -1992, - 237 с.], мала місце диференційна залежність Амітозину від метильованого (В) (здоровий донор) та гіпометильованого (С) (хворий на пухлинну прогресію) стану геномних ДНК лімфоцитів (Фіг.1). На рівні бласттрансформованих лімфоцитів виявлена специфічність флуоресценції амітозину лише з інтерфазним гетерохроматином у хворих на онкологічну прогресію (тиреоїдний рак, n=153; колоректальний рак, n=174), пов'язаною з геномним ДНК- гіпометилуванням і не виявлялась флуоресценція Амітозину з інтерфазними лімфоцитами здорових донорів (n =128) (Фіг.2), у яких профіль ДНК-гіпометилування був відсутній (за попередніми даними заявки на корисну модель № u200508943 від 21.09.2005 р.). Модельною системою ДНК-гіпометилування була культура клітин лімфоцитів крові здорових донорів, що культивувалась в присутності ДНК-деметилуючого реагенту 5-аза-цитидину (10-5М) та Амітозину (25 мкг/мл) на протязі 48 год. в термостаті при температурі 37°С. Показано, що Амітозин виявляє специфічну флуоресценцію інтерфазних клітин лімфоцитів здорових донорів, що культивувались з ДНК-деметилуючим реагентом, на відміну від контрольних лімфоцитів здорових донорів без 5-аза-цитидину (Фото 1-4; Фіг.2). Таким чином, протипухлинний препарат - "Амітозин" - можна вірогідно пов'язувати з виявленням раннього механізму ДНК-гіпометилування при пухлинній прогресії на рівні соматичних клітин крові. Окрім того, нами показано, що при пухлинній прогресії має місце суттєва аномалія в профілі геномної ампліфікації гену ДНК-метилтрансферази 1, ключового ферменту епігенетичного механізму ДНК-метилування геному, за методом ПЛР (Фото 5), Нами виявлена важлива суттєва кореляція між дією Амітозину в культурі лімфоцитів хворих з пухлинною прогресією та відсутністю аномального профілю ампліфікації ДНК-метилтрансферазного гену, що виявляється у геномних ДНК лімфоцитів хворих на пухлинну прогресію, у порівнянні з геномною ДНК здорових донорів (Фото 5). Продукт ампліфікації гену ДНК-метилтрансферази 1 при культивуванні лімфоцитів хворих на пухлинну прогресію в присутності Амітозину адекватно відповідав продукту ампліфікації гену ДНК-метилтрансферази 1 здорової геномної ДНК (128 п.н). Таким чином, протипухлинний спектр дії Амітозину може вірогідно пов'язуватись саме з протекторною дією в ранньому

молекулярному механізмі аномального геномного ДНК-гіпометилування при пухлинній прогресії. Отримані результати дають підставу стверджувати, що Амітозин є адекватним інструментом у способі виявлення та корекції раннього аномального молекулярного механізму ДНК-гіпометилування на рівні соматичних клітин крові при пухлинній прогресії.

Приклади.

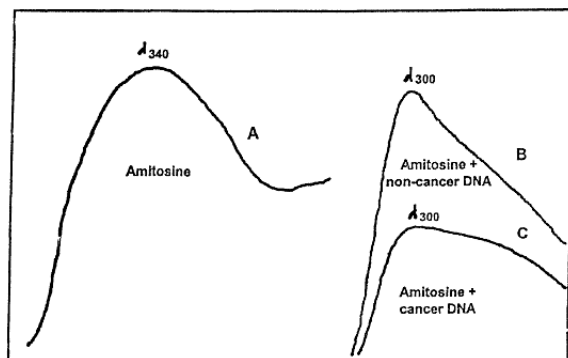
Хвора Н., 17 років, пройшла лікування з хірургічним втручанням у Київському Центрі лікування та реабілітації хворих з патологією щитоподібної залози (клінічна лікарня N16). За верифікацією діагнозу на основі УЗІ, гормонального аналізу та морфологічної експрес-діагностики тканини залози під час операції хвора мала карциному щитоподібної залози з лімфопроліферативним метастазуванням.

За пропонованим способом відбирали 5мл периферійної крові хворої (внутрішньовенне) до оперування та лікування. Лімфоцити хворої (0,5мл цільної крові на 5мл середовища RPMI 1640 з 10% ембріональної телячої сироватки та 0,01мг мітоген-стимулюючого фітогемаглютиніну) культивували в присутності Амітозину (25мкг) на протязі 48 годин. За контроль мали культуру лімфоцитів периферійної крові здорового донора. Методом флуоресцентної мікроскопії була виявлена амітозин-специфічна флуоресценція лімфоцитів хворої, за відсутності флуоресценції контрольних лімфоцитів, що культивувались також з Амітозином. За результатами аналізу було встановлено, що амітозин-специфічна флуоресценція лімфоцитів хво-

рої адекватно асоціюється з пухлинною прогресією та корелює з клінічною верифікацією онкодіагнозу.

Хвора О., 32 років, пройшла лікування з хірургічним втручанням в Центрі лікування та реабілітації хворих з патологією щитоподібної залози (клінічна лікарня N16), за верифікацією клінічного діагнозу – карцинома щитоподібної залози. За способом корисної моделі фіксували амітозин-специфічну флуоресценцію культури лімфоцитів периферійної крові хворої при культивуванні з Амітозином, у порівнянні з контролем здорового донора, методом флуоресцентної мікроскопії. Встановлена кореляція флуоресценції лімфоцитів периферійної крові хворої при культивуванні з амітозином та клінічною верифікацією онкозахворювання.

Хворий П., 50 років, пройшов лікування з хірургічним втручанням в Інституті онкології АМН України, з клінічною верифікацією діагнозу колоректальний рак. За методом флуоресцентної мікроскопії виявлена амітозин-специфічна флуоресценція лімфоцитів периферійної крові хворого, що відбирались до операції та культивувались, як у наведеному прикладі 1 та 2, в присутності Амітозину. Контрольні лімфоцити периферійної крові здорового донора культивувались за аналогічними умовами в присутності Амітозину. Показана амітозин-специфічна флуоресценція тільки лімфоцитів периферійної крові хворого при культивуванні з Амітозином, у порівнянні з контролем. Встановлена кореляція амітозин-специфічної флуоресценції лімфоцитів хворого з онкологічною прогресією за даними клінічного діагнозу.



А - амітозин (25 мкг/мл)  
В, С - ДНК (10мкг/мл)+Амітозин (25 мкг/мл)

Фиг. 1

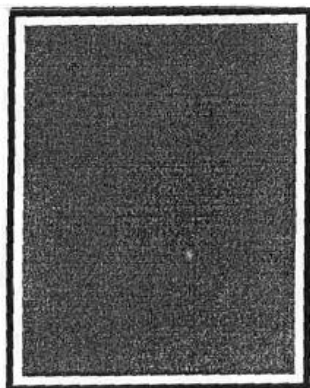
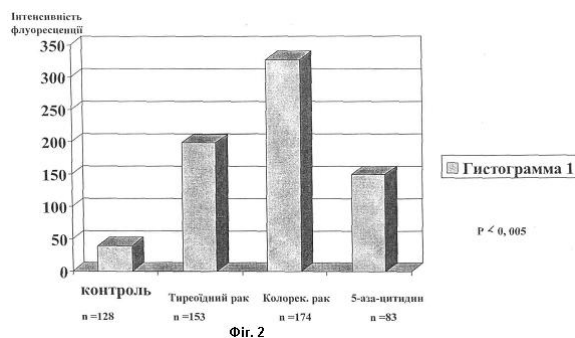


Фото 1 - Контроль



Фиг. 2

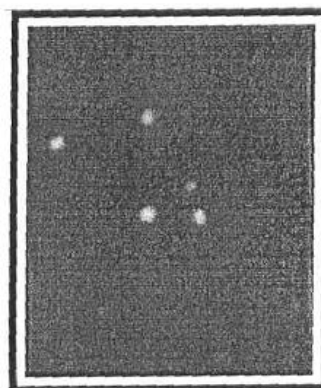


Фото 2 - Колоректальний рак

7

15873

8

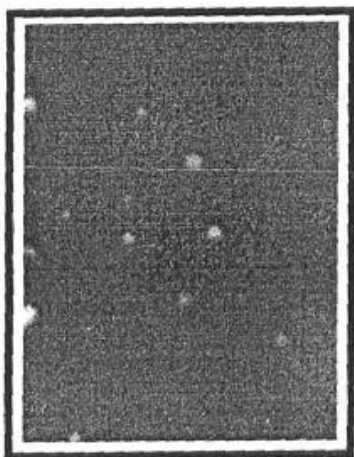
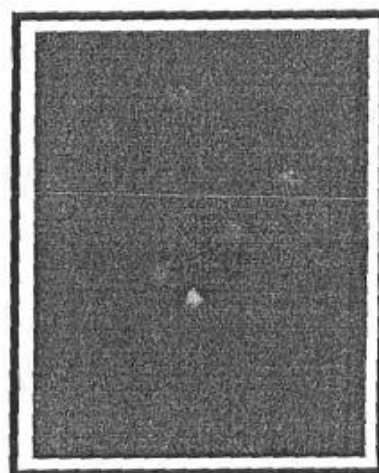
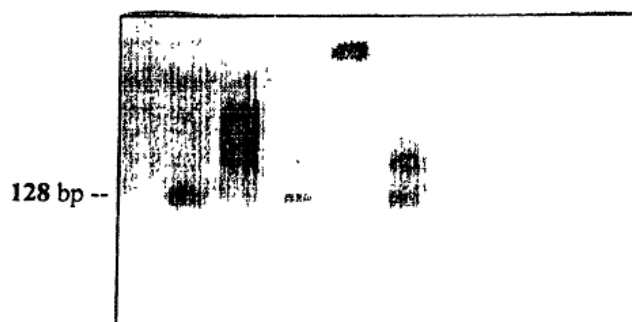


Фото 3 - Рак щитовидної залози

5-Аза-цитидин  
Фото 4

1 2 3 4 5

1. Геномна ДНК здорового донора;
2. Геномна ДНК з онкологічною прогресією;
3. Онкологічна прогресія + Амітозин (культура лімфоцитів в присутності амітозину, 72 год.);
4. Внутрішній ПЛР - контроль;
5. Мітогенстимульована культура лімфоцитів здорового донора, 72 год.;

Фото 5